

AROMÁS SZTEROIDOK NEM SPECIFIKUS JÓDOZÁSA ÉS

HIDROXILÁLÁSA PEROXIDÁZZAL

/Az összehasonlító anyagok szintézise és tulajdonsá-
gainak vizsgálata/

D o k t o r i _ é r t e k e z é s

Rakonczay Zoltán

JATE Biokémiai és Genetikai Csoport, Szeged

- 1 9 7 2 -

Diss. B 879



- T a r t a l o m -

	Oldal
I. Elméleti rész	1
II. Kísérleti rész	10
1. Anyagok	10
2. LP enzim preparálása	10
3. Tirozin jódozása	12
4. Ősztron és Ősztradiol jódozása	14
5. 2 jód származékok szintézise	28
6. 2-, 4-, nitro Ősztron és nitro Ősztradiol, 2-, 4-, hidroxil Ősztron és hidroxil Ősztradiol szintézise	31
7. A ^{131}I beépülésének függése a H_2O_2 koncentrációtól TP enzimmél	40
8. A ^{131}I beépülésének függése a szubeztrát koncentrációtól TP enzimmél	43
9. I_3^- mérése	49
III. A kísérleti eredmények értékelése	52
I r o d a l o m	55

I. Elméleti rész

Bevezetés

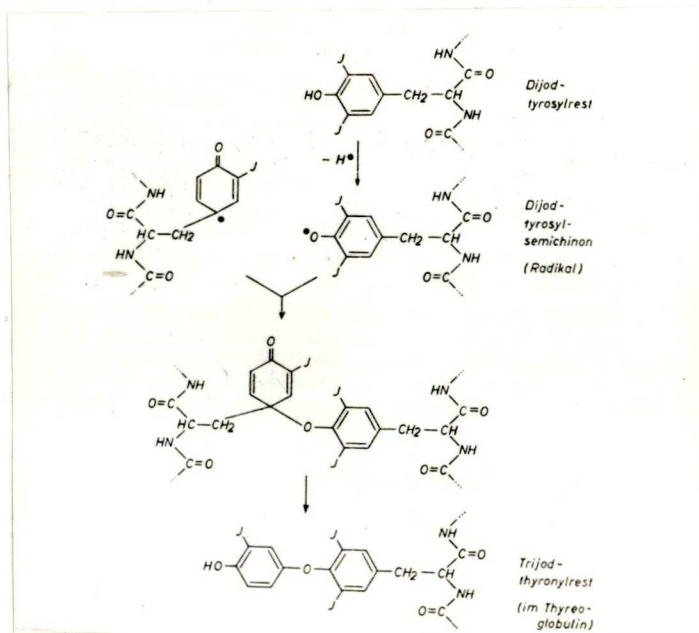
Az aromások jódozását különféle körülmények között és a peroxidázok nem specifikus szerepét a jód, általában a halogének beépítésében sokan tanulmányozták /Roche és munkatársai 1954; Covelli és Wolf 1966; Hager és munkatársai 1966; Thomas és Hager 1969/ miután ez a reakció a tiroxin szintézis alapja a pajzsmirigyben. Ezen vizsgálati módszerek igen változatosak, de megegyeznek abban, hogy először izolálták a jódozott származékokat, majd meghatározták a jódbeépülés helyét az organikus vegyületekbe.

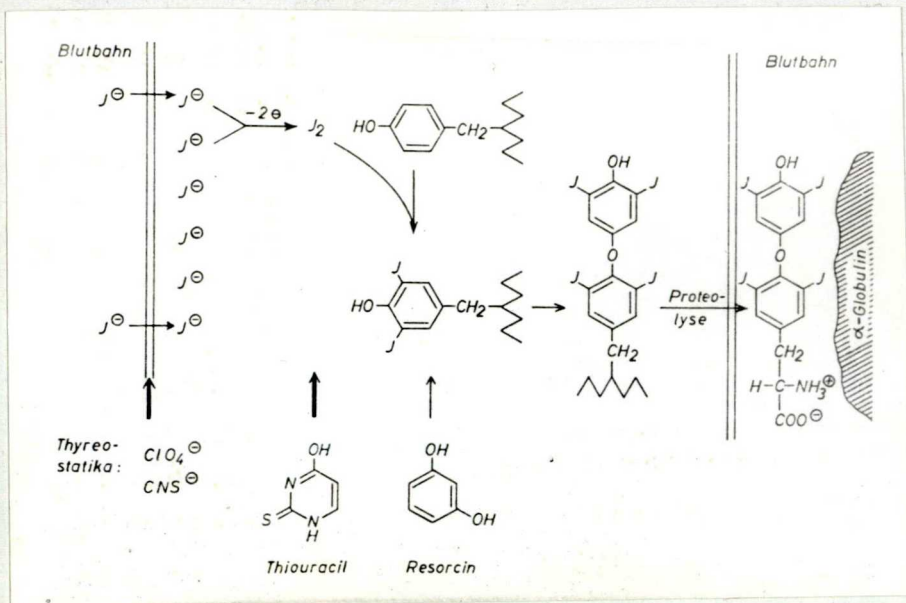
A pajzsmirigy hormonja a tiroxin, szerkezetét tekintve tetrajód-tironin. /Dijódoxifenil-dijódtirozin/. Rádióaktív jód izotóppal végzett kísérletek arra mutattak, hogy a pajzsmirigy a jódot csaknem 100-szor gyorsabban köti meg és tárolja, mint az egyéb szövetek. A tiroxin szintézis úgy megy végbe, hogy az anorganikus jódból és tirozinból a pajzsmirigy monojód-tirozint vagy két jód kötődésével dijód-tironint készít. Két-két molekula dijód-tironinból oxidatív úton aminopropionsav lehasadása mellett keletkezik a tiroxin. /1. ábra/.

A jódbeépülést valószínűleg egy jódináze nevű enzim katalizálja, de a pajzsmirigyben lévő peroxidáz enzimeknek /tiroid peroxidáz, Schultz 1970/ is szerepe lehet a beépülésben. A jódbeépülés mechanizmusának sok részlete ma még ismeretlen. Feltételezik azonban azt, hogy a deha-

logézésben is a peroxidáz enzimek játszanak fő szerepet /Jolin 1971/.

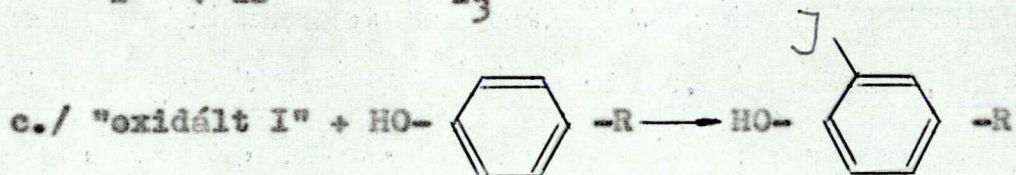
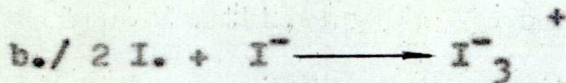
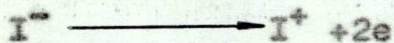
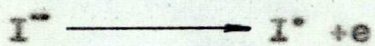
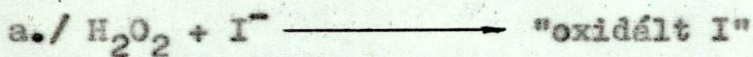
A tiroxin, peptidekhez, aminosavakhoz kötődve mint tireoglobulin raktározódik fel a follikulusok kolloidjában. A tireoglobulint a kolloidokban lévő proteolitikus enzim a szükséglethez képest lebontja és a szabaddá vált tiroxin a véráramba jut. A vérben a hormon ismét fehérjékhez albuminokhoz és globulinokhoz kapcsolódik s ilyen módon transzportálódik a különböző szövetekbe és így játszódik le az inaktiválódása is. /2. ábra/





2. ábra

A peroxidázok katalizálta jódozásos reakciókra a következő egyenleteket javasolják:



+ I_3^- = perjodát ion

A peroxidáz részt vesz a jódid oxidálásában /a reakció/, azonban ennek a reakciónak a mechanizmusa ismeretlen. A jódid oxidálható egy-két elektron átadással, másrészt I_3^- keletkezhet /b reakció/, amely spektrofotometriásan jól mérhető /Alexander 1962/. Bayse és Morrison 1971 megállapították, hogy alacsony pH-n /3.6/ a fenol komponens és a jód spontán reakciója nagyon lassu, míg a peroxidáz enzim katalizálta reakció igen gyors. A jódozásos reakcióban feltételeznek egy második enzimet a jódinázé-t /De Groot és Davis 1962; Yip 1965/. Ez az enzim katalizálja feltehetőleg az "oxidált jódid" és a fenol vegyület közti reakciót /c reakció/. A peroxidáz szerepe összhangban van a sémával, egyszerűen oxidálja a jódidot.

A peroxidáz oxidáló képességének mérésére több módszert dolgoztak ki. Pl. aromás fenolek és aminok oxidációja egyszerű módszerrel mérhető /Hosoya és Morrison 1967/, a guaiacol oxidációját vette alapul és különböző hemoproteinek oxidációs képességét adták meg GU/ μ mol egységben.

Hemoproteinek katalizálta guaiacol oxidáció

Hemoprotein preparátum	GU/ μ mol
Laktoperoxidáz	4,40
Myeloperoxidáz	2,10
Tisztított tyroid peroxidáz	1,15
Tornaperoxidáz c	1,50
Tornaperoxidáz	2,20
Ló hemoglobin	0,000006
Emberi hemoglobin	0,000045

Jódbeépülés mérésére kidolgozott módszerek

- I. Spektrofotometriás módszer, ahol a jódid oxidációs termékét az I_3^- -ot mérik ultraibolya tartományban /Hosoya 1963; Alexander és Scheig 1968/.
- II. Spektroszkópiai változáson alapuló módszer. Ez a módszer a halogenizációs reakció következtében beálló spektroszkópiai változáson alapul, amely azonban csak akkor alkalmazható, ha jódzott vegyületek spektruma eltér a nem jódzottaktól. Hager és munkatársai /1966/ kiterjesztették ezt a módszert a reakció kinetikájának tanulmányozására.
- III. Specifikus haloíd szenzorok alkalmazása. Ezzel a módszerrel $1 \times 10^{-7} M$ jódid koncentráció változás is mérhető /Morrison 1968/.
- IV. Rádióaktív izotópok alkalmazása. Pl. ^{131}I -vel való mérés.

A peroxidázok katalizálta Tyr jódozásának kinetikáját ezéles körben kutatják. Többen kimutatták, hogy lehetséges a Tyr jódozása laktoperoxidáz, tormaperoxidáz, cloroperoxidáz és nyers marha tiroidperoxidáz által /Coval és Taurog 1967; Hager és munkatársai 1966; Klebanoff és munkatársai 1962; Ljunggren 1966; Taurog és Howells 1966; Thomas és Hager 1969; Yip és Hadley 1966; Bayse 1971/.

A teljes jódozási reakció legalább három szubsztrátot foglal magába és kétségtelen többlépcsős folyamatnak tekinthető. Ezért a peroxidáz katalizálta jódozás kinetikája komplex. A jódozási reakció 3 komponense: H_2O_2 , I^- és a fenol komponens. Feltehetőleg az enzim először

oxidálódik és egy relative stabil formát képez a peroxiddal.

A hidroxilálás fiziológiai szempontból az élőlények minden csoportjában nagy jelentőségű, bár jelentősége különböző természetű. A fehérjék, aminosavak, nukleinsavak, lipidek, szénhidrátok és az aromás vegyületek metabolizmusát a hidroxilálás segíti elő. Egyrészt azért, hogy biológiailag aktívak legyenek, másrészt, hogy vízben és testnedvekben jobban oldódó vegyületek keletkezzenek. A mitokondriális és a mikroszomális monooxigenázok a hidroxilálással a különböző gyógyszerek és testidegen anyagok detoxikálását végzik.

A szteroid hidroxilázoknál a biológiai hatás dominál, de a hidroxilázok egy része részt vesz a szteroid vegyületek dezaktiválásában is, azaz olyan formába alakításába, amely a szervezetből kiürül.

Az állati szervezetben lejátszódó hidroxiláló folyamatok két csoportba oszthatók:

- | | | |
|--------------------|---|----------------|
| a./ specifikus | } | hidroxilálások |
| b./ nem specifikus | | |

A specifikus hidroxilálások szubsztrátjai a szervezet anyagai. A nem specifikus hidroxilázok nemcsak saját leggyakoribb szubsztrátjuk, hanem a szervezet számára felesleges, vagy idegen anyagok hidroxilálását is elősegítik.

Számos szerző kimutatta, hogy az űsztron gyorsan inaktiválódik az élő szervezetben /Zondek 1942; Westerfeld 1940; Graubald 1941, 1942; Klebanoff 1960/.

Ezekben a folyamatokban számos, az élő szervezetben előforduló enzim vesz részt. Pl. aszkorbinsavoxidáz, fenoloxidáz, mieloperoxidáz, laktoperoxidáz, mellékvese peroxidázok /Matkovics, Rajki, Szónyi 1972/.

A kísérleteket két peroxidáz enzimmel végeztük a lakto-és tormaperoxidázzal. A legújabb enzimbesorolás Thomas E. Barman /1969/ szerint a 2 enzim egy csoportba tartozik /E.C. 1. 11. 1. 7./.

A laktoperoxidáz-t az állati szervezet több szövétől mutatták ki: nyál-, könny-, emlőmirigyekben, tejben, stb. A laktoperoxidáz érdekes tulajdonsága, hogy 38 molekula szénhidrátot tartalmaz enzim molekulánként. Ezért azt tételezik fel, a szénhidrátok képezik az enzim belső elektron donorját. Proesztétikus csoportja vas-hem /0,06 % vas enzim molekulánként/, ml ext. koeff. 412 nm-nél 114.

Az emlős peroxidázok közül a laktoperoxidázt izolálták először kristályos formában /Theorell and Akerson 1943/. Érdekes, hogy az enzimet először csak a tavaszi tejből tudták előállítani, a téli tejből nem. Később Polis és Shmunkler 1953/ megbízhatóbb izolálást közöl.

A peroxidáz elektroforézisekor két formát kaptak a téli tejből való izoláláskor és csak egy formát a tavaszi tejből. A két enzim spektrumukban és átviteli számukban /turnover number/ is eltértek. Valószínűleg

izozimek, amelyek közül a különböző időszakokban egyik vagy másik mennyisége a nagyobb.

A tormaperoxidáz. Növényi peroxidáz. Prosztétikus csoportja vas-hem. Először Theorell /1941/ állította elő kristályos állapotban a tormagyökérből elektroforézis segítségével.

Torma és laktoperoxidáz tulajdonságainak összehasonlítása

	Ms:	Hem/mol.	max. látható tartományban			
			ox.	red.	red.CO	CN ⁻
Laktoperox.	78000	1	412	438	425	432
Tormaperox.	40000	1	403	440	423	432

A legújabb irodalom szerint a laktoperoxidáz jól felhasználható jelzett / I¹³¹ / fehérjék és fehérje természetű hormonok előállítására. /Miyachi 1972; Marchalonis 1972; Owen 1972/.

Munkánk egyik célja összehasonlító anyagok előállítása, mivel feltételezhető, hogy a fenolszteroidok inaktiválódásáért az aromás gyűrűbe beépülő hidroxil csoport, vagy csoportok a felelősek. Ezért előállítottuk a 2 hidroxil ösztrent, 2 hidroxil ösztradiolt, 4 hidroxil ösztrent és 4 hidroxil ösztradiolt.

A nem specifikus jódbéépülés vizsgálatával pedig jelzett ösztront, illetve ösztradiolt állítottunk elő, ugyanekkor vizsgálat tárgyává tettük a jódbéépülés körülményeit, tanulmányozni kívántuk a béépülés optimális paramétereit és mechanizmusát.

II. Kísérleti rész

1. Anyagok:

A felhasznált oldószerek és anyagok "a.l.t.

Reanal" minőségűek voltak.

Kivétel: Üsztron /Chinoin Gyógyszergyár Bp./ metanolból 2 x átkristályosítva Op: 268-271 C°.

Üsztradiol /Smith-Kline. French. Labs. Philadelphia/ Op: 175-177 C°.

/TP/ Tormaperoxidáz enzim /Reanal/ Aktivitás
1 mg enzim 100 M H₂O₂-t bont 25 C°-on 1 perc alatt.

/LP/ Laktoperoxidáz enzimet magunk preparáltunk.

Kromatográfiás adszorbensek: Kieselgel G nach Stahl /Merck/, Szilikagel G /Reanal/, Al₂O₃B/I. /Merck/.

A felhasznált készülék típusok: Unicam SP 200 infravörös automata spektrofotométer, Spektronom 360 spektrofotométer. "Desaga" típusu kromatográfiás rétegező készülék. A jódtól részére használt műszerek "Gamma" gyártmányúak voltak. Scaler: NK 108; Detektor: Na-131. Kristály: S-1120680 típusu volt. A vékony rétegek kiértékelése "Packard Model 7201" Radio-chromatogram Scanner-en történt.

2. Laktoperoxidáz enzim preparálása /Polis and Shmunkler 1953/

Kereskedelmi lefölözött nem pasztörözött tejet használtunk. A kazeint koagulálással távolítottuk el oltóenzimmel /500 mg/l/. 37 C°-on egy óráig állni hagytuk,

majd a létrejött kazein precipitátumot szűrőssel távolítottuk el.

A kazein kicsapása $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -el is történhet az izoelektromos ponton pH 6,0, 1,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -el. A sóval történő precipitálás alacsonyabb kitermelést eredményez az enzimen. A szűrést $3\text{ }^\circ\text{C}$ -on végeztük. A további tisztítási lépések a következők voltak:

"1" lépés: A savó proteint szilárd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hozzáadásával precipitáltuk a végső koncentráció 2,8M pH 6,0-nál. Egy óráig lassan kevergettük, majd a csapadékot szűrtük egy éjszakán át $3\text{ }^\circ\text{C}$ -n.

"2" lépés: A precipitátumot újból oldottuk vízben 3 % protein koncentrációra. Na-tetraborátot adtunk /végső koncentráció 0,1M/ és $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -et 1,5 M-ra. A csapadék a tejsavó alkalikus foszfatázát tartalmazza.

"3" lépés: Növelve a sókoncentrációt 1,9 M-ra egy világos narancs színű precipitátumot kaptak /xantin oxidáz/. A csapadékot kiszűrtük.

"4" lépés: Az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koncentrációját 2,5 M-ra emeltük, a precipitátum tartalmazza a peroxidázt. A további kromatográfiás tisztítási lépést nem alkalmaztunk.

A csapadékot minimális mennyiségű pH 5-ös acetát pufferben oldottuk, majd pár csepp toluol hozzáadásával tartósítottuk. Aktivitás 4×10^{-8} M hígítás 140 mg I/ml.

3. Tirozin jódozása

Az optimális feltételeket /Morrison 1970/ alapján állítottuk össze.

A reakcióelegy összetétele a következő volt:

H ₂ O ₂	3,5 x 10 ⁻⁷ M
I ⁻	3,3 x 10 ⁻⁷ M /KI/
szubsztrát	5,0 x 10 ⁻⁷ M
0,05 M acetát puffer pH 5	
enzim.	
EDTA	1 x 10 ⁻⁶ M

A végtérfogat minden esetben 5 ml volt. Az inkubációs idő 60 perc szobahőmérsékleten, aerob körülmények között.

Laktoperoxidáz katalizálta jódbeépülés tirozinba

Laktoperoxidáz: aktivitás 4x10⁻⁸M-os higitás 140 mg I/ml.⁺

Minta higitás M-ban	Δ ext.290 nm	keletkezett MIT 10 ⁻⁵ M	MIT/Tyr x100 %
I. 4 x 10 ⁻⁷	0,007	0,3	0,6
II. 4 x 10 ⁻⁸	0,062	2,65	5,3
III. 4 x 10 ⁻⁹	0,072	3,0	6,0
IV. 4 x 10 ⁻¹⁰	0,006	0,25	0,5

I. táblázat

Tornaperoxidáz katalizálta jódbeépülés tirozinba

Tornaperoxidáz: aktivitás $10^{-8}M$ 130 mg I/ml.⁺

II. táblázat

Minta hígítás M-ban	Δ ext.290 nm	keletkezett MIT $10^{-5}M$	MIT/Tyrx100 %
I. 1×10^{-7}	0,082	3,5	7,0
II. 1×10^{-8}	0,042	1,8	3,6
III. 1×10^{-9}	0,00	0	0
IV. 1×10^{-10}	0,01	0,42	0,84

Az L-Tyr \longrightarrow L-3-I Tyr /MIT/ átalakulás mérése 290 nm történt, mivel ezen a hullámhosszon a legnagyobb az eltérés az L-Tyr és a MIT abszorpciója között. A δ moláris ext. koef. ennél a hullámhossznál 2340. Így ezt az értéket használtuk fel a MIT produkció méréséhez. A reakciót enzimmel vagy H_2O_2 -vel indítottuk. Mindkét küvettában H_2O_2 helyett desztillált vizet adtunk. A kettő közötti különbség az Δ ext.

⁺ Aktivitás mérés Matkovic B., Kovács E./1958/ után.

4. Ösztrol és ösztradiol jódozása

A tirozin jódozása után feltételeztük, hogy a peroxidázok katalizálta jódozás más szubsztrátokon is lehetséges. A fenol szteroidokat /ösztrol, ösztradiol/ gyakran alkalmazzák mint model vegyületeket.

Ezekből 5×10^{-7} M-os oldatokat állítottunk elő. Mivel vízben nem oldódnak, az oldódást 3-5 % propilén glikollal segítettük elő. A kapott oldatok opálos színűek voltak.

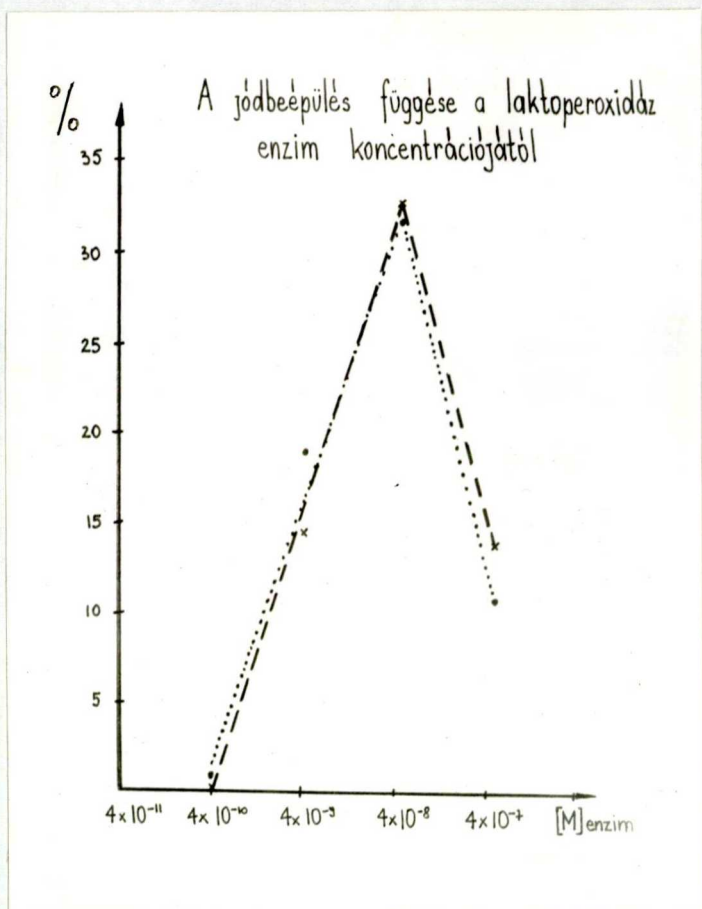
A reakciós elegy összeállítása azonos volt a tirozinnál leírtakkal, azonban a KI oldathoz 0,1 ml Na 131 I izotóp oldatot adtunk. Ez a mennyiség a KI koncentrációját nem befolyásolta. A kontrol összeállításánál H_2O_2 helyett azonos térfogatu desztillált vizet, a második kontrolnál enzim helyett puffert adtunk az elegyhez.

A reakció időtartama alatt az enzim aktivitása nem változik, amit méréssel ellenőriztünk.

Meghatározott idő után a felesleges jódot tiosulfáttal megkötve leállítottuk a reakciót. A keletkezett terméket azonos térfogatu peroxid mentes éterrel többször extraháltuk, majd szárítottuk izitott Na_2SO_4 -on. Az extraktumot kémcsőbe öntve azonnal mértük üreges kristály mérőfejjel. A 131 I mérése a 131 I fotocsucsán differenciál diszkriminátor állásban történt.

Ezek után megvizsgáltuk a jódbeépülés függését a lakto-és tormaperoxidáz enzim koncentrációjától,

/3-4. ábra, III-IV. táblázat/, valamint az optimális enzim koncentrációnál követték a jódbepülés %-át az idő függvényében /5-6. ábra, V-VI. táblázat/.



A reakció elegy tartalmazott: $3,3 \times 10^{-7}$ M KI / ^{131}I /; $1,0 \times 10^{-6}$ M EDTA; $3,5 \times 10^{-7}$ M H_2O_2 ; $5,0 \times 10^{-7}$ M ösztrolt vagy ösztradiolt; 0,05 M acetát puffer pH 5,0 és laktoperoxidáz változó mennyiségét. A végtérfogat 5 ml volt.

3. ábra

- - - - - Ösztrol

. Ösztradiol

Laktoperoxidáz katalizálta jódbeépülés ösztromba és
ösztradiolba

Laktoperoxidáz aktivitás 4×10^{-8} M-os hígítás 140 mg I/ml.

Jódbeépülés függése a laktoperoxidáz enzim koncentrációjától
ösztromnál

Hígítás M-ban	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %
4×10^{-7}	3048	19414	22462	13,57
4×10^{-8}	5306	10954	16260	32,63
4×10^{-9}	3212	19332	22544	14,24
4×10^{-10}	5	24718	24723	0,02
4×10^{-11}	14	24350	24364	0,05

Inkubációs idő: 60 perc Hőmérséklet: 20 °C
Kontrol /K/ : 350 cpm Háttér /H/ : 257 cpm

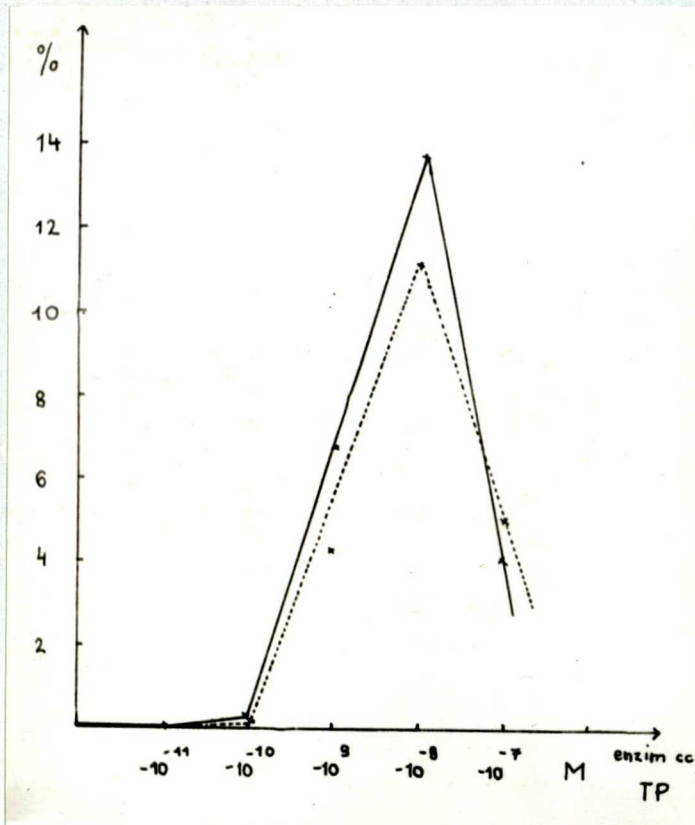
Jódbeépülés függése laktoperoxidáz enzim koncentrációjától
ösztradiolnál

Hígítás M-ban	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %
4×10^{-7}	2190	18675	20865	10,5
4×10^{-8}	5962	12599	18561	31,8
4×10^{-9}	3616	15516	19132	18,9
4×10^{-10}	225	20794	21019	1,07
4×10^{-11}	6	22159	22165	0,03

Inkubációs idő: 60 perc Hőmérséklet: 20 °C
Kontrol /K/ : 286 cpm Háttér /H/ : 225 cpm

III. táblázat

A jódbeépülés függése a tormaperoxidáz enzim koncentrációjától



A reakció elegy tartalmazott: $3,3 \times 10^{-7}$ M KI ^{131}I /; $1,0 \times 10^{-6}$ M EDTA; $3,5 \times 10^{-7}$ M H_2O_2 ; $5,0 \times 10^{-7}$ M ösztront vagy ösztradiolt; 0,05 M acetát puffer pH 5,0 és tormaperoxidáz változó mennyiségét. A végtérfogat 5 ml volt.

4. ábra

- - - - - ösztron ösztradiol

Tormaperoxidáz katalizálta jódbeépülés ösztronba és
ösztradiolba

Tormaperoxidáz aktivitás $10^{-8}M$ 130 mg I/ml.

Jódbeépülés függése a tormaperoxidáz enzim koncentrációjától
ösztronnál

Higitás M-ban	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
10^{-11}	0	34425	34425	0
10^{-10}	68	31628	31696	0,22
10^{-9}	2236	31597	33833	6,6
10^{-8}	3704	23151	26855	13,79
10^{-7}	706	17562	18268	3,86

Inkubációs idő: 60 perc Hőmérséklet: 20 C^o
Kontrol /K/ : 312 cpm Háttér /H/ : 267 cpm

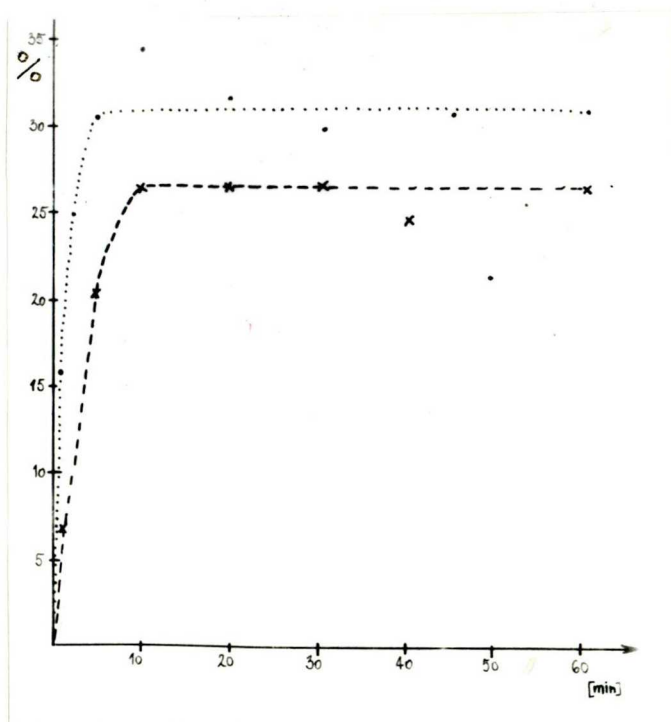
Jódbeépülés függése tormaperoxidáz enzim koncentrációjától
ösztradiolnál

Higitás M-ban	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
10^{-11}	0	12602	12602	0
10^{-10}	14	12744	12758	0,11
10^{-9}	587	13798	14385	4,25
10^{-8}	1701	13504	15205	11,18
10^{-7}	708	14863	15641	4,97

Inkubációs idő: 60 perc Hőmérséklet: 20 C^o
Kontrol /K/ : 307 cpm Háttér /H/ : 223 cpm

IV. táblázat

A jódbeépülés függése az időtől laktoperoxidáz
enzimnél



A reakció elegy tartalmazott: $3,3 \times 10^{-7} \text{ M KI } /^{131}\text{I}/$;
 $1,0 \times 10^{-6} \text{ M EDTA}$; $3,5 \times 10^{-7} \text{ M H}_2\text{O}_2$; $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ösztron
vagy ösztradiolt; $0,05 \text{ M}$ acetát puffer pH 5,0 és
 $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ laktoperoxidázt. A végtérfogat 5 ml volt.

5. ábra

- - - - - ösztron ösztradiol

Jódbeépülés függése az időtől laktoperoxidáz enzimnél

Ösztron

Laktoperoxidáz 4×10^{-8} M-os hígításnál az aktivitás: 140 mg I/ml.

Idő /min/	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H. /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
1	1026	14024	15050	6,81
5	3924	15448	19372	20,25
10	4033	11153	15186	26,55
20	6320	17410	23730	26,63
30	4516	12728	17244	26,18
40	3517	10722	14239	24,7
60	4929	13868	18796	26,21

Kontrol /K/: 355 cpm Hátter /H/: 240 cpm Hőmérséklet: 20 C°

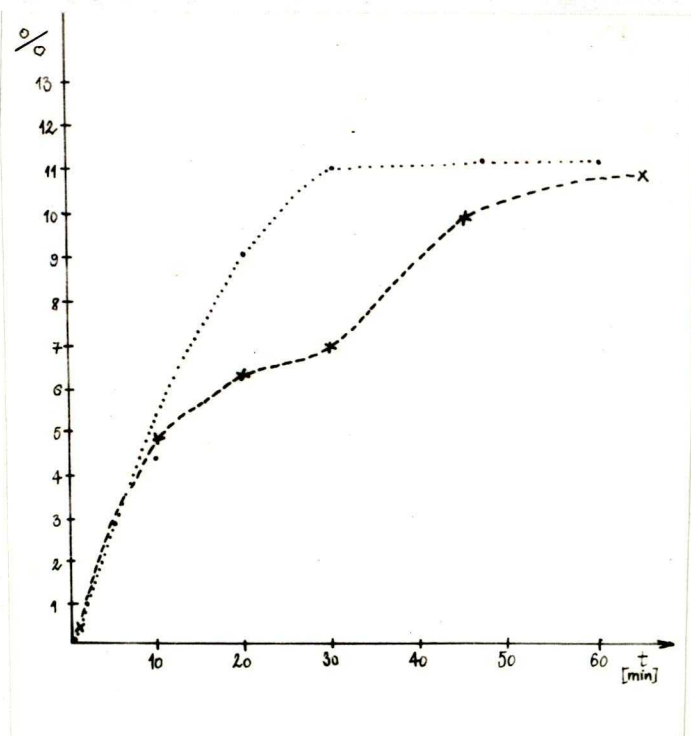
Ösztradiol

Laktoperoxidáz 4×10^{-8} M-os hígításnál az aktivitás: 140 mg I/ml.

Idő /min/	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H. /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
1	2447	13011	15458	15,83
2	3933	11800	15733	24,99
5	5010	11555	16565	30,24
10	5901	11150	17051	34,60
20	5205	11173	16378	31,78
30	5130	12001	17131	29,94
45	5508	12504	18012	30,57
60	5031	11281	16312	30,8

Kontrol /K/: 300 cpm Hátter /H/: 240 cpm Hőmérséklet: 20 C°

A jódbeépülés függése az időtől torma-peroxidáz
enzimnél



A reakció elegy tartalmazott $3,3 \times 10^{-7} \text{ M KI } /^{131}\text{I}/$;
 $1,0 \times 10^{-6} \text{ M EDTA}$; $3,5 \times 10^{-7} \text{ M H}_2\text{O}_2$; $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ösztromon
vagy ösztradiolt; $0,05 \text{ M}$ acetát puffer pH 5,0 és
 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ torma-peroxidázt. A végtérfogat 5 ml volt.

6. ábra

----- Ösztromon Ösztradiol

Jódbeépülés függése az időtől tormaperoxidáz enzimnél

Ösztron

Tormaperoxidáz koncentrációja 10^{-8} aktivitás 130 mg I/ml.

Idő /min/	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
1	59	14179	14238	0,41
2	144	13723	13867	1,04
5	379	12465	12844	2,95
10	626	12533	13159	4,75
20	998	14740	15738	6,35
30	960	12931	13891	6,91
45	1146	10469	11615	9,86
65	1383	11328	12711	10,88

Kontrol /K/: 285 cpm Háttér /H/: 241 cpm Hőmérséklet: 20 C°

Ösztradiol

Tormaperoxidáz koncentrációja 10^{-8} aktivitás 130 mg I/ml.

Idő /min/	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
1	21	12292	12313	0,17
2	155	15244	15399	1,0
5	493	16360	16853	2,9
10	832	18491	19323	4,3
20	1689	17040	18729	9,01
30	1942	15689	17631	11,01
47	2027	16288	18315	11,06
60	1480	11748	13228	11,18

Kontrol /K/: 298 cpm Háttér /H/: 237 cpm Hőmérséklet: 20 C°

Az aktív öszttron és öszttradiol éteres extraktumát vékony réteg kromatográfiásan megfuttattuk és próbáltuk a keletkezett termékeket elkülöníteni. Futató elegy: Benzol: etanol / 89 : 11/ . Rétegkromatográfiás körülmények: /adszorbens Kieselgel - G, fel szálló kromatográfia/.

A kromatogram kiértékelése "Packard Model 7201" Radio chromatogram Scanner-en történt. /Matkovics, Rakonczay, Rajki, Baláspiri 1971; Rakonczay, Matkovics 1972/.

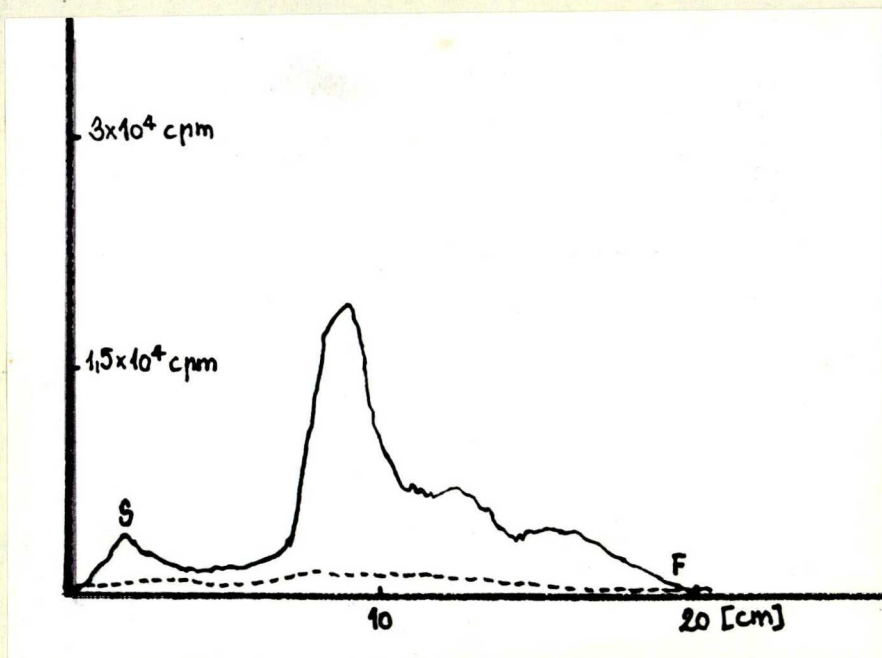
A rádiokromatogram csucai alapján az R_f -ek a következők voltak:

LP öszttron	:	0,40
LP öszttradiol	:	0,37
TP öszttron	:	0,39
TP öszttradiol	:	0,38

A foltok előhívása foszforsav : viz = 1 : 1 arányu elegyével való lefujással, majd 100-120 C^o-on 45 percig tartó szárítással is elvégezhető.

Feltételeztük, hogy a jód a 2-es szénatomra épül és a rádiokromatogram /7-10 ábra/ kiértékelése után összehasonlító anyagot szintetizáltunk és előállítottuk a 2 jód öszttront és 2 jód öszttradiolt. /Matkovics, Rakonczay, Kovács, 1972/.

Laktoperoxidáz katalizálta ^{131}I beépülés
űsztrónba /rádiokromatogram/



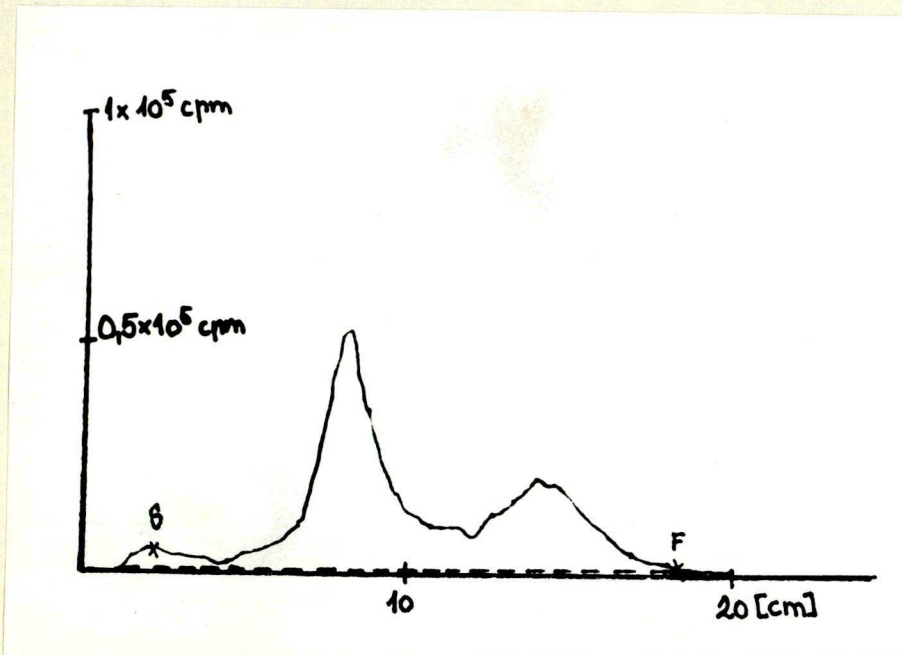
S = start

F = front

- - - - - kontrol

7. ábra

Laktoperoxidáz katalizálta ^{131}I beépülés
ösztadiolba /rédiokromatogram/



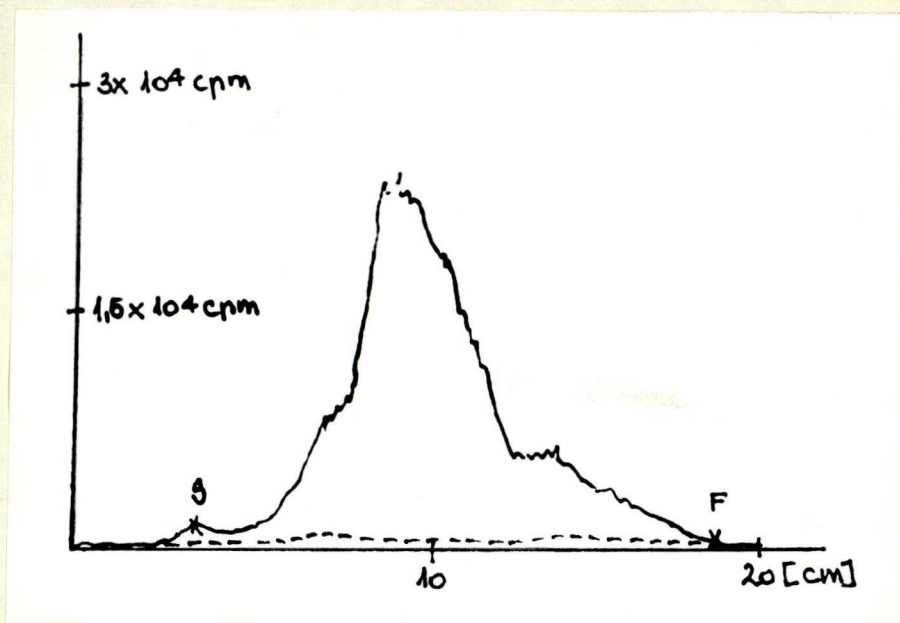
S = start

F = front

- - - - kontrol

8. ábra

Formaperoxidáz katalizálta ^{131}I beépülés
űsztronba /rádiókromatogram/



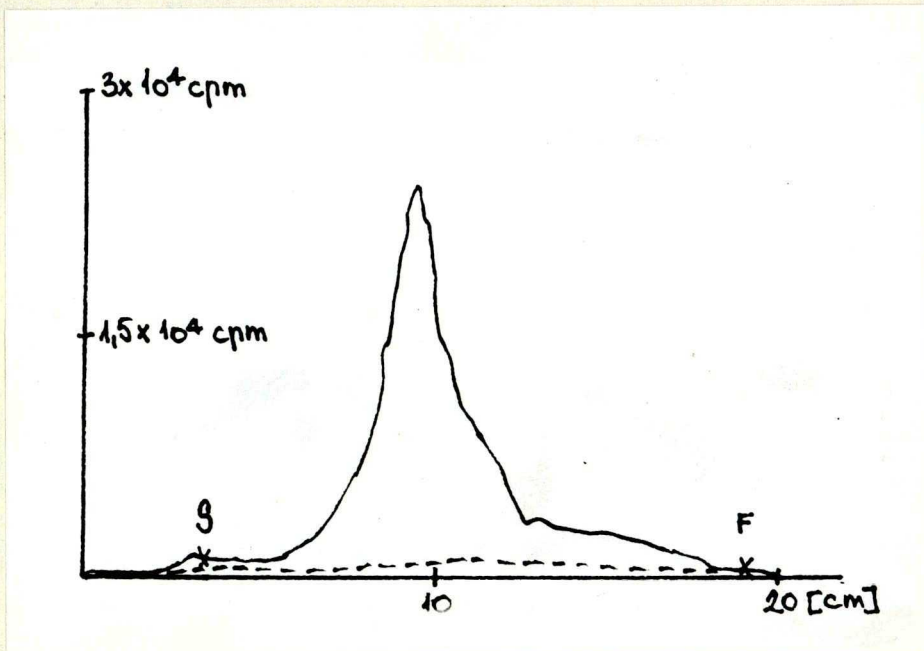
S = start

F = front

- - - - kontrol

9. ábra

Tormaperoxidáz katalizálta ^{131}I beépülés
ösztradiolba /rádiókromatogram/



S = start

F = front

- - - - - kontrol

10. ábra

5. 2 jód származékok szintézise

1. / 2 jód észtron készítése

Hillmann-Elies /1953/; Hillmann-Elies /1955/

270 mg észtront 5 ml forró jégecetben oldottuk és 45-50 C° között hozzáadtunk 100 mg Hg /II/ acetátot 10 ml ecetsavban, amit forrón 260 mg I₂-vel elegyítettünk. 5 perc alatt történt a hozzáadás csepegtetés formájában. Egy óráig szobahőmérsékleten állni hagytuk és ezalatt a felesleges jód Hg /II/ I₂ formájában vált ki. Leszűrtük és az ecetsav fő tömegét lepároltuk. A Hg /II/ I₂ maradékot KI-vel oldatban tartottuk. A 2 jód észtront 50 ml vízre üntéssel nyertük. Megadott Op: 184 C°. A kapott anyagot Al₂O₃ /Merck/ B/IV/ aktivitású oszlopon kromatografáltuk. A leoldás benzollal történt. A 2 jód észtron az első frakciókban jött le az oszlopról és a szolvens elpárologtatása után tiszta 2 jód észtront kaptunk.

2 jód észtron: Ms: 396,08, Op: 178-180 C°

C₁₈H₂₁O₂I számított: C_{54,51}, H_{5,3}, I_{32,05}

talált: C_{54,68}, H_{5,12}, I_{31,82}

EtOH max = 297 nm $\frac{20}{D} = -106 \pm 2^\circ$ /c=1,0; CHCl₃/

✓ KBr max : 3350 /OH/; 1750 /C=O/ 1450, 900 /Ar/ cm⁻¹

2./ 2 jód ösztradiol készítése

Hillmann-Elies /1953/ Hillmann-Elies /1955/

272 mg ösztradiolt 10 ml ecetsavban oldottunk és 45-55 °C közötti hőmérsékleten 260 mg I₂-t adtunk hozzá. A továbbiakban a jód ösztronnál leírtak szerint jártunk el.

2 jód ösztradiol Ms: 398,08 Op: 174-76 °C
/Irod. Op: 130 °C/

C₁₈H₂₃O₂I: számított: C_{54,3} H_{5,87} I_{31,63}

talált : C_{54,15} H_{5,7} I_{31,2}

EtOH max = 297 nm $\frac{20}{D} = + 123 \pm 2^\circ /c 1,0, EtOH/$

✓ KBr max 3400 /OH/, 1410, 900 /Ar/ cm⁻¹

A rádiokromatogram alapján kapott R_F értékek közel azonosak voltak a szintetizált 2 jód ösztron ill. 2 jód-ösztradiollal.

Közvetve is bebizonyítottuk, hogy a jód a C-2-es helyzetbe épül be. Szubsztrátnak előállítottuk a 2 nitro; 4 nitro; 2, 4 dinitro ösztront. Ezekkel is elvégeztük az enzimátikus jódozást.

VII. táblázat

Szubsztrát	Extr.-K. /cpm/	Maradék-H /cpm/	Σ /cpm/	Jódbeép. %-ban
2-NO ₂ ösztron	48	15 849	15 891	0,3
4-NO ₂ ösztron	457	15 083	15 540	2,94
2-4 di NO ₂ ösztron	5	16 050	16 055	0,03

Kontrol /K/ : 273 cpm

Háttér /H/ : 254 cpm

Hőmérséklet: 20 C°

Reakció idő: 60 perc

A legnagyobb beépülés a 4-NO₂ ösztronnál volt. Ez csak azzal magyarázható, hogy a 2-es helyzet szabad és ide épülhet a jód. Sokkal kevesebb jód épül a 4-es helyzetbe.

Összehasonlító vizsgálat céljára a következő nitro, amino és hidroxil ösztron ill. ösztradiol vegyületeket állítottuk elő.

6. 2-, 4-, nitroösztrom és nitroösztradiol, 2-, 4-, hidroxiosztrom és ösztradiol szintézise

2 és 4-nitro-ösztrom készítése /I,II/

Werbin, Holoway /1956/, Niederl, Vogel /1949/, Hillmann-Elies /1953/.

1 g ösztromot 30 ml jégcetben oldottunk melegén, majd cseppenként 0,18 ml cc. HNO_3 -at /fs: 1,42/ adtunk hozzá, miután a hőmérséklet $45\text{ }^\circ\text{C}$ -ra hült. A keletkező narancssárga oldatot egy éjszakán át állni hagyttunk. A kivált világossárga 4-nitro-ösztromot kiszűrtük, ecetsavval mostuk és szárítottuk. A keletkezett 4-nitro-ösztromra vonatkozóan a termelés 35 %-os volt.

4-nitro-ösztrom /II/ $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$ Ms: 315,36

Op: $277-78\text{ }^\circ\text{C}$ /Irod. op: $270-280; 258\text{ }^\circ\text{C}$ /

Számított: C 68,55 H 6,71 N 4,44

Talált: N 4,41

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -299 \pm 2^\circ$ /c 0,003 EtOH/

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3350 /O/; 1535 /Ar- NO_2 /; 1030, 825, 800 /C- NO_2 / cm^{-1} .

A filtrátumot 300 ml vízbe öltöttük és a kapott sárga precipitátumot szűrtük és szárítottuk. A kiszűrt szteroid keverék benzolos oldatát 200 g Al_2O_3 /Merck/ B/IV. aktivitású oszlopon kromatografáltuk. A leoldás benzollal történt. Az oszlopról először a 2-nitro-, majd a 4-nitro-származék oldódott le, míg a keletkező 2,4-dinitroösztrom, valamint egyéb termékek az oszlopon maradtak. 1 g ösztromnak 40 %-a alakult át 2-nitro-ösztromná. A

szolvens elpárologtatása után nyertük a tiszta 2-nitro-
ösztront.

2-nitro-ösztron /I/ $C_{18}H_{21}O_4N$ Ms: 315,36

Op: 276-80 C° /Irod. op: 183,5-184; 155 C°/

Számított: C 68,55 H 6,71 N 4,44

Talált: N 4,41

$[\alpha]_D^{20} = + 30 \pm 2^\circ$ /c 1,0; $CHCl_3$ /

$\nu_{\text{KBr max}}$ 3350 /OH/; 1750, 1640, 1530 /Ar-NO₂/; 880,
760, 650 /C-NO₂/ cm⁻¹.

2- és 4-nitro-ösztradiol készítése /III, IV/

2- és 4-nitro-ösztronból készítettük NaBH₄-es reduk-
cióval. T.L. Patton /1959/.

500 mg nitroösztront 30 ml metanolban oldottuk, majd
200 mg NaBH₄-et adtunk az oldathoz. Egy éjszakán át állt
szobahőmérsékleten, majd 150 ml vízbe öntöttük, amit
6 N HCl-al savanyítottunk. A csapadékot szűrtük és eta-
nolból átkristályosítottuk.

2-nitro-ösztradiol /III/ $C_{18}H_{23}O_4N$ Ms: 317,38

Op: 159-63 C° /Irod. op: 164-167 C°/

$[\alpha]_D^{20} = + 160 \pm 2^\circ$ /c 1,0; $CHCl_3$ /

Számított: C 68,12 H 7,30 N 4,41

Talált: N 4,48

$\nu_{\text{KBr max}}$ 3490, 3300, 2950 /OH/; 1630, 1525 /Ar-NO₂/;
900, 865, 760 /C-NO₂/ cm⁻¹.

4-nitro-ösztadiol /IV/ $C_{18}H_{23}O_4N$ Ms: 317,38

Op: 190-193 C° /Irod.op: 220 C° /

Számított: C 68,12 H 7,36 N 4,41

Talált: N 4,48

$[\alpha]_D^{20} = + 250 \pm 2^\circ$ / c 1,0; $CHCl_3$ /

v. KBr max 3200, 2950 /OH/; 1530 /Ar- NO_2 /; 1050,

825 /C- NO_2 / cm^{-1} .

2- és 4-amino-öszttron és -ösztadiol készítése /V-VIII/

Kraychy és Gallagher /1957/.

1,12 g nitro-öszttron, - ösztadiolt 230 ml acetone és 100 ml víz elegyében oldottuk. 50 ml 1 N NaOH oldatot és 6 g Na-hidroszulfidot / $Na_2S_2O_4$ / adtunk hozzá, majd 10 percig melegítés és kevergetés közben visszafolyattuk. Továbbiakban ismételten hozzáadtunk 50 ml lugot és 4 g Na-hidroszulfidot, majd folytattuk a visszafolytatást még 20 percig. Ez idő alatt az alapoldat sárga színe eltűnik. Az acetont vákumban lepárooltuk, majd az elegyet hig ecet-savval neutralizáltuk. 2,5 órai jégszekrényben való tartás után a kivált precipitátumot szűrtük, vízzel mostuk, majd szárítottuk. A reakció kitermelése közel 100 %-os.

2-amino-öszttron /V/ $C_{18}H_{23}O_2N$ Ms: 285,38

Op: 190-193 C° /Irod. op: 220 C° /

Számított: C 75,75 H 8,14 N 4,91

Talált: N 4,67

$$[\alpha]_D^{20} = -40 \pm 2^\circ \quad /c\ 0,5; \text{CHCl}_3/$$

✓ KBr max 3500, 3390 /primer NH₂/; 3350 /OH/; 1290 /NH₂/ cm⁻¹.

4-amino-észtron /VI/ C₁₈H₂₃O₂N Ms: 285,38

Op: 249-52 C°

Számított: C 75,75 H 8,14 N 4,91

Talált: N 4,67

$$[\alpha]_D^{20} = +50 \pm 2^\circ \quad /c\ 0,2; \text{MeOH}/$$

✓ KBr max 3420, 3380 /primer NH₂/; 3350 /OH/; 1620, 1300, 1270 /NH₂/ cm⁻¹.

2-amino-észtradiol /VII/ C₁₈H₂₅O₂N Ms: 287,4

Op: 184-90 C°

Számított: C 75,23 H 8,76 N 4,87

Talált: N 4,72

$$[\alpha]_D^{20} = -130 \pm 2^\circ \quad /c\ 0,1; \text{MeOH}/$$

✓ KBr max 3390, 3320, 2950 /OH, NH₂/; 1730, 1600, 1290, 1220 /NH₂/ cm⁻¹.

4-amino-észtradiol /VIII/ C₁₈H₂₅O₂N Ms: 287,4

Op: 265-68 C°

Számított: C 75,23 H 8,76 N 4,87

Talált: N 4,72

$$[\alpha]_D^{20} = -90 \pm 2^\circ \quad /c\ 0,1; \text{dimetilszulfoxid}/$$

✓ KBr max 3390, 3320, 2950 /OH, NH₂/; 1620, 1300, 800 /NH₂/ cm⁻¹.

2- és 4-dihidroxi-öszttron és ösztradiol készítése diazotálással

Kraychy, Gallagher /1957/, Niederl és Vogel /1949/.

Az előzőekben kapott amino-öszttront 15 ml 40 %-os kénsavban oldottuk és 0-4 C^o-on diazotáltuk 940 mg NaNO₂-el, melyet 2 ml vízben oldottunk. A NaNO₂ oldatot 5 perc alatt, cseppenként adtuk a savas oldathoz. A keveréket 17 percig állni hagytuk 0 C^o-on, majd 0,6 ml 40 %-os karbamid oldatot adtunk hozzá.

2- és 4-hidroxi-öszttron és -ösztradiol készítése

Niederl és Vogel /1949/

A 2 vagy 4 diazoniumklorid öszttron oldatát a fent leírt módon preparáltuk 800 mg 2 vagy 4 nitro öszttronból. Az elegyhez 8 g CuSO₄ x 5 H₂O 16 ml vízben oldott forró oldatát adtuk és a keveréket 15 percig refluxáltuk. Miután lehült 24 órán át 5 C^o-on állt. A sötét vörösesbarna produktumot szűrtük, mostuk vízzel és szárítottuk vákumban. A nyersanyag sulya 400 mg; 7,2 ml jég-ecetsavban és 0,8 ml cc HCl-ben melegítettük forráspontig, majd 800 mg cinkport adtunk részletekben a forró oldathoz és refluxáltuk 30 percig. Miután lehült a főlúszó oldatot dekantáltuk 40 ml vízbe. A precipitátumot mostuk 20 %-os ecetsavval és vízzel, majd vákumban szárítottuk.

A keletkező hidroxi-termékeket preparatív rétegekromatográfiával választottuk el a szintézis utolsó lépései során visszaalakult öszttron és ösztradioltól. A kapott

anyagkeveréket kloroformban oldottuk, Silicagel /Merck/ G nach Stahl szerint készült közepes vastagságu lapra, 0,5 cm-es csikban vittük fel és acetón-ciklohexán-kloroform /1:2:2/ elegyében megfuttattuk. A hidroxizsztronnak megfelelő foltot /azonosítás R_f érték alapján/ a lapról lekapartuk és acetón-kloroform /1:2/ elegyével eluáltuk. Az extraktumot vákumban, N_2 -gáz átbuborékolgatás közben lepároltuk, s a keletkezett termék kromatográfián már tiszta volt.

2-OH-ösztron /IX/ $C_{18}H_{22}O_3$ Ms: 286,37

Op: 116-18 C° /Irod.op: 200 C° /

✓ KBr_{max} 3350 /OH/; 1710, 1610, 1290 /Ar/ cm^{-1} .

4-OH-ösztron /X/ $C_{18}H_{22}O_3$ Ms: 286,37

Op: 228-35 C°

✓ KBr_{max} 3400, 3350 /OH/; 1720, 1290 /Ar/ cm^{-1} .

2-OH-ösztradiol /XI/ $C_{18}H_{24}O_3$ Ms: 288,38

Op: 192-96 C°

✓ KBr_{max} 3400 /OH/; 1720, 1510, 1450, 1260 /Ar/ cm^{-1} .

4-OH-ösztradiol /XII/ $C_{18}H_{24}O_3$ Ms: 288,38

Op: 166-170 C°

✓ KBr_{max} 3400 /OH/; 1710, 1610, 1510, 1250 /Ar/ cm^{-1} .

Az összehasonlító anyagokat több rendszerben /Kieselgel G-en/ felszálló kromatográfiával megfuttattuk.

Ö = ösztron

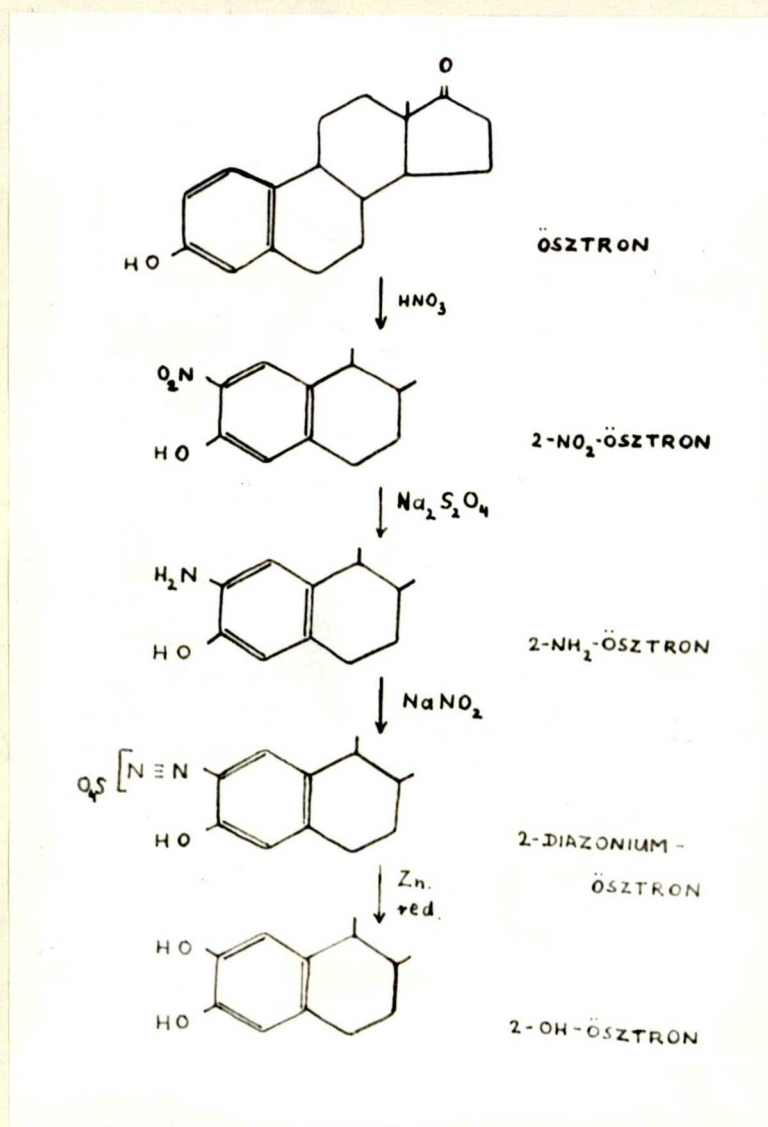
Öd = ösztradiol

A szintetizált összehasonlító anyagok R_F értékei

különféle futtató rendszerekben

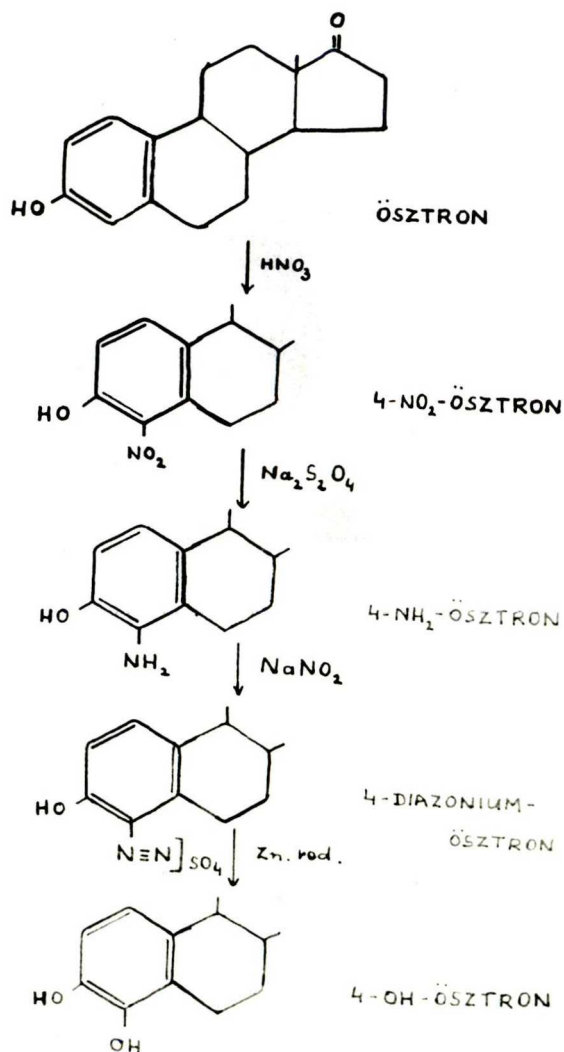
Vegyület	Benzol: EtOH = 89 : 11 /R _F /	AcOH+c.he- xán:CHCl ₃ = 1:2:2 /R _F /	n-heptán: - aceton= 2 : 1 /R _F /	c.hexán: CHCl ₃ :COH= 7 : 2 : 1 /R _F /
Ö	0,74	0,94	0,26	0,18
2-NO ₂ -Ö	0,88	0,96	0,36	0,42
4-NO ₂ -Ö	0,56	0,98	0,22	0,30
2-NH ₂ -Ö	0,43	0,08	0,17	0
4-NH ₂ -Ö	0,50	0,12	0,21	0
2-OH-Ö	0,36	0,61	0,12	0,06
4-OH-Ö	0,52	0,64	0,19	0,11
2- I-Ö	0,4	0,87	0,29	0,45
Öd	0,43	0,71	0,24	0,17
2-NO ₂ Öd	0,56	0,91	0,34	0,34
4-NO ₂ Öd	0,38	0,87	0,23	0,24
2-NH ₂ -Öd	0,40	0,04	0,16	0
4-NH ₂ Öd	0,43	0,04	0,18	0
2-OH-Öd	0,32	0,88	0,14	0,08
4-OH-Öd	0,37	0,91	0,14	0,06
2- I-Öd	0,39	0,89	0,25	0,28

2 hidroxi ösztron szintézisének fő lépései



11. ábra

4 hidroxi öszttron szintézisének fő lépései



12. ábra

Mivel a jódbepülés függ a H_2O_2 és a szubsztrát koncentrációtól, ezért meghatároztuk ezen 2 komponens optimumát a beépülés szempontjából TP enzimnél.

/IX-X. táblázat, 13 ábra. ill. XI-XII. táblázat, 14. ábra/.

7. A ^{131}I beépülésének függése a H_2O_2 koncentrációtól,
a tormaperoxidáz enzimnél, az ősztron, mint szubsztrát
esetében

H_2O_2 cc. $\times 10^{-7}$ M	Összakt.-H /cpm/	Extr.-K /cpm/	Beépülés mértéke: %	Beépülési sebesség: V %/perc
0,35	20 021	1 898	9,48	0,156
0,70	19 341	2 768	14,31	0,2365
1,05	17 206	2 506	14,56	0,243
1,40	19 446	2 551	13,12	0,219
1,75	18 521	3 014	16,27	0,271
2,10	17 382	2 517	14,48	0,241
2,45	19 532	2 179	11,15	0,186

$$H = 124 \text{ /cpm/}$$

$$K = 877 \text{ /cpm/}$$

Az inkubáció ideje: 60 perc, 25 C°-on.

IX. táblázat

A ^{131}I beépülésének függése a H_2O_2 koncentrációtól,
a tormaperoxidáz enzimnél, az ösztradiol, mint szub-
sztrát esetében

H_2O_2 cc. $\times 10^{-7}$ M	Összakt.-H /cpm/	Extr.-H /cpm/	Beépülés mértéke %	Beép.-K %	Beépülési sebesség ↓ %/perc
1,05	16 254	2 222	13,60	8,53	0,142
1,40	16 639	2 281	13,70	8,63	0,143
1,75	17 206	2 630	15,30	10,23	0,170
2,10	17 108	2 661	15,55	10,48	0,174
2,45	14 754	2 312	15,67	10,60	0,176
2,80	15 969	4 163	26,07	21,00	0,350
3,15	17 112	2 955	17,30	12,23	0,204
3,50	17 700	2 999	16,90	11,83	0,197

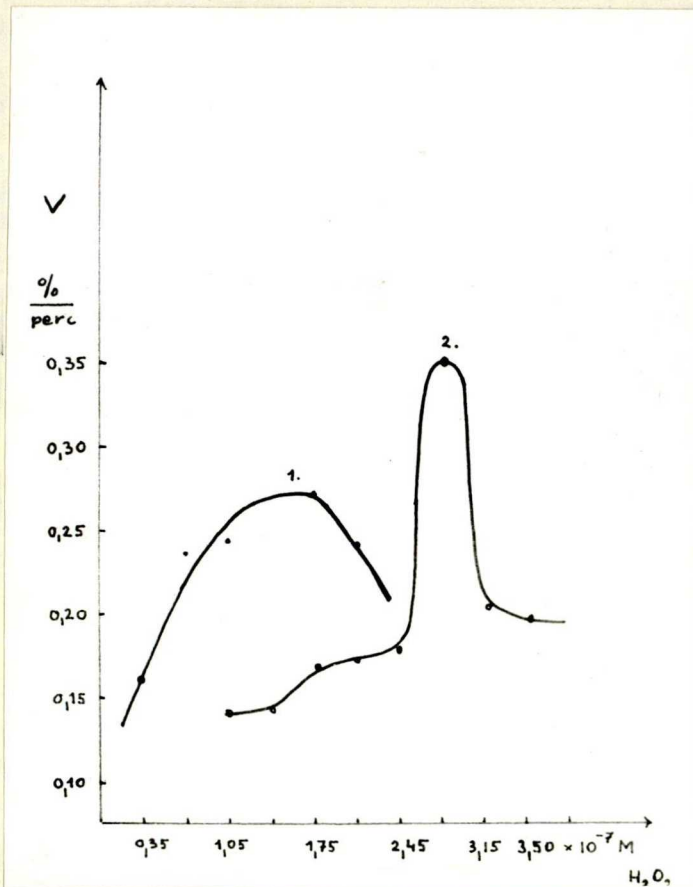
K = Kontrol: 866 5,70

H = Háttér: 143 /cpm/

Az inkubáció ideje: 60 perc, 25 C^o-on

X.. táblázat

A ^{131}I beépülésének függése a H_2O_2 koncentrációtól,
a tormaperoxidáz enzimmél, az ősztron és az ősztra-
diol esetében



A reakció-elegy tartalmazott: $3,3 \times 10^{-7}$ M KI / ^{131}I /;
 $1,0 \times 10^{-6}$ M EDTA; $5,0 \times 10^{-7}$ M ősztront vagy ősztradiolt;
 $0,05$ M acetát puffer pH 5,0; 1×10^{-8} M tormaperoxidázt
és H_2O_2 változó mennyiségét. A végtérfogat 5 ml volt.

13. ábra

1. ősztron

2. ősztradiol

8. A ^{131}I beépülésének függése az ősztron, mint szubsztrát koncentrációtól a torma-peroxidáz enzimnél

Szubszt. cc. /S/ $\times 10^{-7}\text{M}$	Összakt.-H /cpm/	Extr.-H /cpm/	Beépülés mértéke %	Beépülés -K %	Beépülési sebesség /V/ %/perc
0,4	14 223	4 719	33,17	32,24	0,553
0,5	15 660	5 471	34,93	34,00	0,582
1,0	15 385	5 712	37,19	36,26	0,619
1,5	16 842	7 357	43,68	38,44	0,726
2,0	15 471	7 601	49,13	43,89	0,819
Kontrol 1:	17 063	160	0,93		
Kontrol 2:	16 380	859	5,24		

H = Háttér: 136 /cpm/

Inkubációs idő: 60 perc, 25 C°-on.

XI. táblázat

A Michaelis állandó $[K_M]$ meghatározása:

A Michaelis állandó grafikus ábrázolásán alapuló meghatározására több módszer ismeretes. A leggyakrabban használt, Lineweaver-Burk módszernél az alábbi egyenletből indulnak ki.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

A fenti egyenlet alapján az $\frac{1}{V}$ értékeket az $\frac{1}{S}$ értékek függvényében ábrázolva, egy olyan egyenest kapunk, melynek iránytangense K_M/V_{\max} ; az ordinátán való metszéspontja $1/V_{\max}$; míg az abszcisszán való metszéspontja $-1/K_M$.

XII. táblázat

$\frac{1}{V}$ /1% perc ⁻¹ /	$\frac{1}{S}$ /x 10 ⁻⁷ M/
1,808	2,50
1,718	2,00
1,617	1,00
1,377	0,66
1,221	0,50

A grafikon alapján kapott értékek:

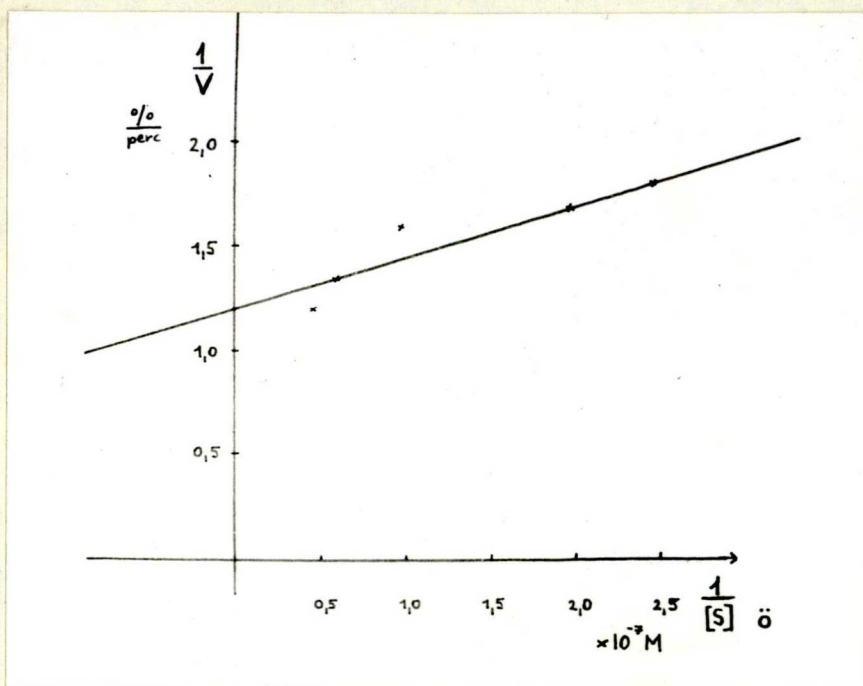
14. ábra XI-XII.- táblázat

$$\frac{1}{V_{\max}} = 1,21$$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} = \frac{0,41}{1,675}$$

$$K_M = \frac{0,41}{1,675 \times 1,21} = \underline{0,202 \times 10^{-7} M}$$

A szubsztrát koncentrációtól való függés ábrázolása
Lineweaver - Burk grafikus módszerével



A reakcióelegy tartalmazott $3,3 \times 10^{-7} \text{ M KI } /^{131}\text{I}/$;
 $1,0 \times 10^{-6} \text{ M EDTA}$; $3,5 \times 10^{-7} \text{ M H}_2\text{O}_2$; $0,05 \text{ M}$ acetát puffer
 $\text{pH } 5,0$; tormaperoxidáz $1,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ üsztron változó
mennyiségét. A végtérfogat 5 ml volt.

14. ábra

A ^{131}I beépülésének függése az ösztradiol, mint szubsztrát koncentrációjától a tormaperoxidáz enzimnél

XIII. táblázat

Szubszt. cc. /S/ $\cdot 10^{-6}\text{M}$	Összakt.-H /cpm/	Extr.-H. /cpm/	Beépülés mértéke %	Beépülés -K %	Beépülési sebesség /V/ %/perc
1,0	16 541	2 772	16,7	11,5	0,191
2,0	16 701	3 409	20,4	15,2	0,253
3,0	15 877	3 538	22,9	17,7	0,295
4,0	16 837	4 750	28,2	23,0	0,383
5,0	15 843	5 856	36,9	31,7	0,529
Kontrol:	15 637	822	5,2		

H = Háttér: 126 /cpm/

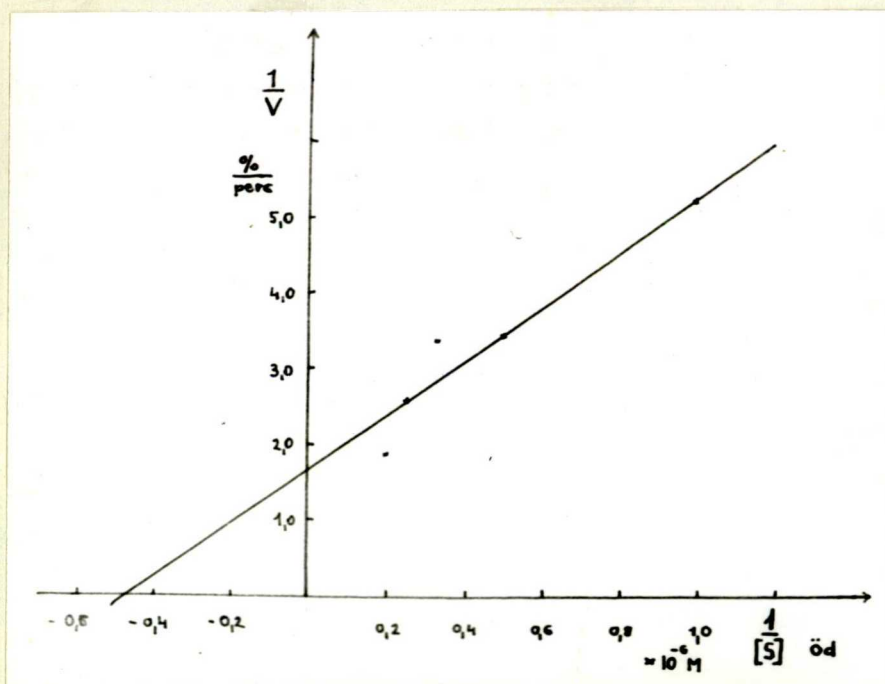
A reakció ideje: 60 perc, 25 C^o-on.

A Michaelis állandó kiszámítása:

$\frac{1}{V}$ /1/% perc ⁻¹ /	$\frac{1}{S}$ /-x 10 ⁻⁶ M/
5,23	1,0
3,95	0,5 0
3,38	0,33
2,61	0,25
1,88	0,20

XIV. táblázat

A szubsztrát koncentrációtól való függés ábrázolása
Lineweaver - Burk grafikus módszerével



A reakcióelegy tartalmazott $3,3 \times 10^{-7} \text{ M KI } /^{131}\text{I}/$;
 $1,0 \times 10^{-6} \text{ M EDTA}$; $3,5 \times 10^{-7} \text{ M H}_2\text{O}_2$; $0,05 \text{ M}$ acetát puffer
 $\text{pH } 5,0$; torma-peroxidáz $1,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ösztradiol változó
mennyiségét. A végtérfogat 5 ml volt.

15. ábra

A grafikon alapján kapott értékek:

15. ábra XIII- XIV. táblázat

$$\frac{1}{V_{\max}} = 1,70$$

$$- \frac{1}{K_M} = 0,475$$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} = \frac{1,45}{0,41}$$

$$K_M = \underline{0,208 \times 10^{-5} M}$$

9. TP katalizálta jodid oxidációjának mérése spekto -
fotometriás módszerrel

A peroxidázok részt vesznek a jodid oxidálásában, és I_2 majd I_3^- keletkezik. Az I_3^- mérésére igen érzékeny a spektrofotometriás módszer. Az I_3^- -nak 353 nm-nél intenzív elnyelési sávja van. A moláris ext. koef. 22900 ± 855 /Alexander 1962/. A keletkezett I_3^- arányos a peroxidáz koncentrációjával megfelelő mérési tartományban. /16. ábra és XV. táblázat/.

XV. táblázat

Idő	$10^{-9}M$ TP Ext.	Keletkezett $I_3^-/x10^{-9}M/$	$10^{-10}M$ TP Ext.	Keletkezett $I_3^-/x10^{-9}M/$
30''	0,095	4,1	0,007	0,32
1,	0,22	9,8	0,015	0,65
1'30''	0,35	11,5	0,028	1,2
2'	0,48	12,1	0,04	1,75
2'30''	0,61	12,7	0,055	2,4
3'	0,73	13,2	0,067	2,9
3'30''	0,86	13,7	0,081	3,5
4'	0,89	13,9	0,095	4,1

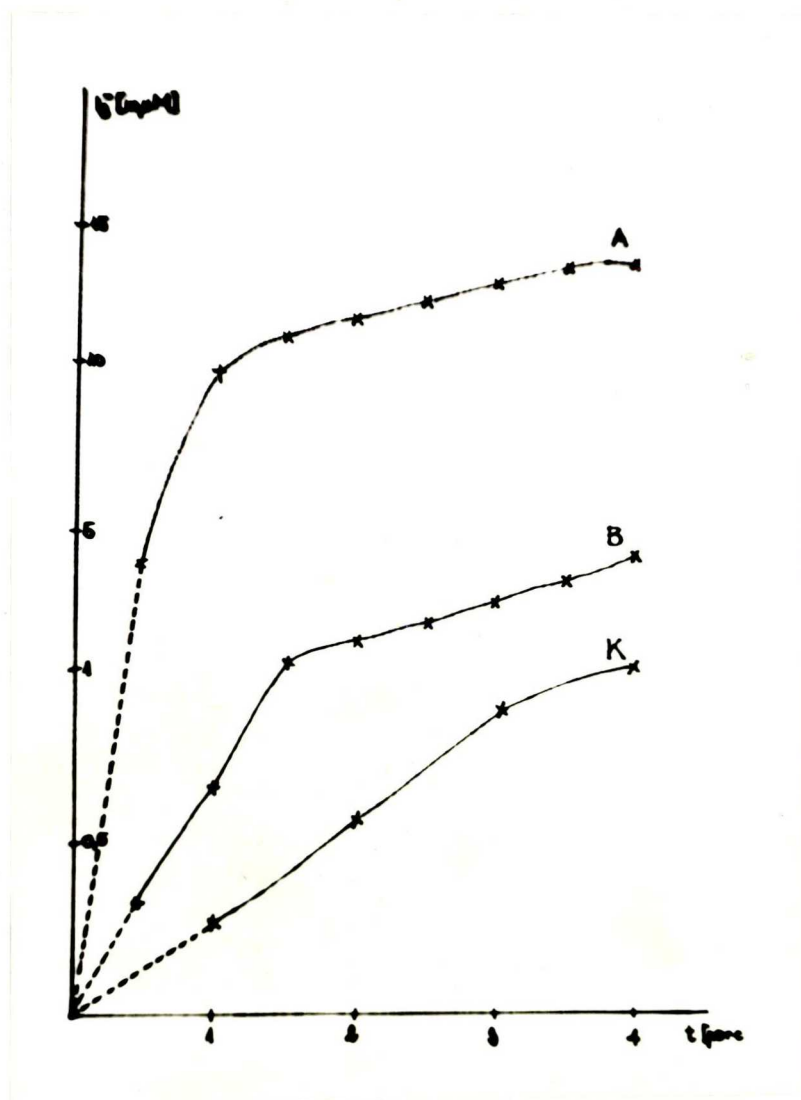


Idő	Kontrol Ext.	Keletkezett $I_3^-/x10^{-9}M/$
1°	0,006	0,26
2°	0,013	0,57
3°	0,02	0,87
4°	0,023	1,0

A kontrolnál enzim helyett desztillált vizet adtunk. A $1 \times 10^{-8} M$ -os TP oldatnál a reakcióelegy igen gyorsan, szinte a hozzáadás pillanatában megsötétedt, ezért ennél a koncentrációnál nem mérhető a I_3^- mennyisége.

Ezen mérések azt bizonyítják, hogy a jódbeépítés során a tormaperoxidáz I_3^- -at termel.

TP katalizálta jodid oxidációjának /I₂/ mérése
spektrofotometriás módszerrel



16. ábra

A reakcióelegy tartalmazott $3,5 \times 10^{-7} \text{ M H}_2\text{O}_2$ -t; $3,3 \times 10^{-7} \text{ M KI}$; $1 \times 10^{-6} \text{ M EDTA}$ -t; $0,05 \text{ M}$ acetát puffert pH 5,0; TP változó mennyiségét /A= $1 \times 10^{-9} \text{ M TP}$, B= $1 \times 10^{-10} \text{ M TP}$ /;
K = kontrol /enzim nélkül/

III. A kísérleti eredmények értékelése

Az irodalmi adatokkal egybehangzóan kimutattuk, hogy a lakto /LP/ és a tormaperoxidáz /TP/ beépíti a jódot a tirozin molekulába.

A jódozási reakciót más szubsztrátokon is elvégeztük és megállapítottuk, hogy az LP ill. a TP képes nem specifikusan jódot beépíteni öszttronba és az öszttradiolba.

A jódozási reakció meghatározott enzim koncentrációnál optimális. Ez TP-nál $1 \times 10^{-8} \text{M}$, a LP-nál 4×10^{-8} -os higitásnál volt optimális. /3-4. ábra, III.-IV. táblázat/.

Ez az optimum azonos azzal az eredménnyel, amit a tirozin jódozásánál észleltünk.

Az LP enzim esetében a jódbeépítés időben gyorsabban következik be mint a TP-nál. Az LP-nál már 10 perc alatt eléri a telítési maximumot, míg a TP-nál 30-60 percre van szükség. /5-6. ábra, V.-VI. táblázat/.

A jódbeépülés nagysága függ a reakcióban résztvevő szubsztrátok / H_2O_2 ; jód; öszttron vagy öszttradiol/ koncentrációjától, melyek közül meghatároztuk a H_2O_2 , valamint az öszttron és öszttradiol koncentráció hatását a ^{131}I izotóp beépülési sebességére a keletkezett termékekben TP enzim jelenlétében..

Az optimális H_2O_2 koncentráció öszttronnál $1,75 \times 10^{-7} \text{M}$ öszttradiolnál $2,8 \times 10^{-7} \text{M}$. /IX.-X. táblázat, 13. ábra/.

A ^{131}I beépülés maximumát az ösztronnál $2,0 \times 10^{-7}\text{M}$, ahol az elegy jód izotóp tartalmának 43,9 %-a épül be. K_M érték grafikus módszerrel meghatározva: $0,202 \times 10^{-7}\text{M}$; $V_{\max} 0,826 \times 10^{-7}\text{M}$ /XI.-XII. táblázat, 14. ábra/.

Az ösztradiol optimális koncentrációja a jódbeépülés szempontjából $5,0 \times 10^{-6}\text{M}$, mely koncentrációnál az elegy izotóp ^{131}I tartalmának 31,7 %-a épül be. $K_M : 0,208 \times 10^{-5}\text{M}$; $V_{\max} 0,588 \times 10^{-5}\text{M}$ /XIII.- XIV. táblázat, 15. ábra/.

A K_M értékek nagyságát összehasonlítva megállapítható, hogy az ösztrom 100 x nagyobb aktivitást mutat a reakcióban, azaz a jódbeépítés az ösztromnál relative könnyebb és nagyobb mint az ösztradiolnál. A különbség valószínűleg a szubsztrát-enzim komplex stabilitásbeli különbségből származik. Azonos idő alatt az ösztromnál a jód %-os beépülése magasabb /43.9 %/, mint ösztradiolnál / 31.7 % /.

A radiokromatogram és a vékonyréteg kromatográfiával nyert R_F -eket összehasonlítva megállapítható, hogy a ^{131}I legnagyobb részt a C-2-es helyzetbe épül. / 7-10 ábra /.

A nitro ösztromokkal végzett mérés is bizonyítja azt, hogy a C-2 helyzetbe történt a beépülés /VII. táblázat/.

Irodalmi adatok szerint a C-2-es szubsztitúció inaktiválja a fenol szteroidokat /2-hidroxi ösztren és 2 hidroxi ösztradiol/. A C-2-es jód ösztrogének aktivitása is század része a kiindulási anyagnak, de nem bizonyított az, hogy az élő szervezetben jód beépüléssel inaktiválódnak a fenol szteroidok.

A preparált jód ösztrogének azonban jól felhasználhatók jelzett fenol szteroidok előállítására, amelyek fiziológiai kísérleteknél előnyösen alkalmazhatók.

A TP oxidálja a J^- -ot I_3^- -á, ami spektrofotometrián mérhető. A keletkező I_3^- arányos az enzim koncentrációjával megfelelő mérési tartományban /16. ábra, XV. táblázat/.

Összehasonlító vizsgálatokra előállítottuk még a következő fenol szteroid származékokat: 2 nitro ösztren; ösztradiolt; 4 nitro ösztren és ösztradiolt; 2 aminos ösztren és ösztradiolt; 4 aminos ösztren és ösztradiolt; 2 hidroxi ösztren és ösztradiolt; 4 hidroxi ösztren és ösztradiolt.

- I r o d a l o m -

Alexander N.M. and Scheig R.:

Anal. Biochem. 22. 187. /1968/

Alexander N.M.:

Anal. Biochem. 4. 341. 1962.

Barman T.E.:

Enzyme Handbook Vol.I. Springer-Verlag Berlin,
Heidelberg New York. 1969.

Bayse G.S. and Morrison M.:

Arch. Biochem. Biophys. 145. 143-148. 1971.

Coval M.I. and Taurog A.:

J. Biol. Chem. 242. 5510. /1967/

Covelli I. and Wolff J.:

Biochemistry 5. 860. /1966/

Gáspár Zs.:

Biokémia. Bp. 1968. Mezőgazdasági Kiadó.

Glick D.:

Methods of Biochemical Analysis Vol.I. Interscience Publishers. New York, London 1954.

Graubard M. and Pincus G. :

Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 27. 149. /1941/

Graubard M. and Pincus G. :

Endocrinology. 30. 265. /1942/

De Groot L.I. and Davis A.M.:

Endocrinology. 70. 492. /1962/

Hager L.P., Morris D.R., Brown F.S. and Eberwein H.:

J. Biol. Chem. 241. 1769. /1966/

Hillmann - Elies, Hillmann A., Schiedt U.:

Z. Naturforsch. B.b. 436. 1953.

Hillmann - Elies A.:

Z. Naturforsch. 10.b. 361. 1955.

Hosoya T.:

J. Biochem. 53. 381. /1963/

Hosoya T.:

J. Biol. Chem. 242. 2828. /1967/

Jolin T. and De Escobar G.M.:

Biochem. J. 125. 869. 1971.

Klebanoff S.I. and Segal S.I. :

J. Biol. Chem. 235. 52. /1960/

Klebanoff S.I., Yip C.C. and Kessler D.:

Biochim. Biophys Acta. 58. 563. /1962/

Ljunggren I.G.:

Biochim, Biophys. Acta. 113. 71. /1966/

Maguire R.I. and Dunford H.B.:

Biochemistry 11. 937. 1972.

Marchalonis I.I.:

Biochem. J. 124. 921. 1972.

Matkovics B., Kovács E.:

Kisérlet. Orvostud. X. 92. /1958/

Matkovics B., Rakonczay Z., Rajki S.E., Balásperi L.:

Steroidologia 2. 77. 1971.

- Matkovics B., Rajki E.S., Szőnyi G.:
Steroidológia /Megjelenés alatt 1972/
- Matkovics B., Rakonczay Z., Kovács K.:
Steroidológia /Megjelenés alatt 1972/
- Miyachi Y.:
J. Clin. Endocr. Metab. 34. 23. 1972.
- Morrison M.:
Gunma Symposia on Endocrinology 5. 239. /1968/
- Morrison M. and Bayse G.S.:
Biochemistry 9. 2995. /1970/
- Niederl J.B. and Vogel H.I.:
J. Am. Chem. Soc. 71. 2566 /1949/
- Owen E.:
Biochem. J. 128. 130p. 1972.
- Patton Tad. L.:
J. Org. Chem. 24. 1795. /1959/
- Polis B. D. and Shmunkler H.N.:
J. Biol. Chem. 201. 475. /1953/
- Rakonczay Z., Matkovics B.:
Biokémiai Vándorgyűlés. 1972. 13. előadás.
- Roche I., Lissitzky S. and Michel R.:
Methods Biochem. Anal. 1. 243. /1954/
- Saunders B.C., Holmes-Siedle A.G., Stark B.P.:
"Peroxidase" London Butterworths /1964/
- Schultz J.:
Biochemistry of the phagocytic process. North-
Holland Publishing Company-Amsterdam. 1970.

Stahl E.:

Thin-Layer Chromatography. Springer-Verlag Berlin Heidelberg - New York. /1969/

Taurog and E. M. Howels :

J. Biol. Chem. 241. 1229. /1966/

Theorell H. and Akeron A.:

Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 17. B.No. 7. /1943./

Thomas I.A. and Hager L.P. :

Biochim. Biophys. Acta 122. 406. /1969/

Went I.:

Elettan. Bp. 1958. Medicina.

Werbin H. and C. Holoway:

J. Biol. Chem. 223. 651. /1956/

Werbin H.:

J. Org. Chem. 21. 1532. /1956/

Westerfeld W.:

Biochem J. 34. 51. /1940/

Zondek B., and Sklow J.:

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49. 629. /1942/

Yip C.C.:

Biochim. Biophys. Acta. 96. 75. /1965./

Yip C.C. :

Biochim. Biophys. Acta. 122. 406. /1966/

Hálás köszönetet mondok dr. Matkovics Béla
egyetemi docens urnak munkám közvetlen irá-
nyításáért, értékes elméleti és gyakorlati
tanácsaiért. Ugyesztén köszönetet mondok Ko-
vács Katalin egyetemi gyakornoknak munkámhoz
nyújtott segítségéért.

